家蚕谷胱甘肽-S-转移酶基因 *BmGSTz1* 的克隆、序列分析及组织表达特征

余泉友[1], 房守敏[2], 左伟东[3], 张　泽[1,4], 鲁　成[4,*]
(1. 重庆大学农学及生命科学研究院, 重庆 400044; 2. 西华师范大学生命科学学院, 四川南充 637002;
3. 西南大学生物技术学院, 重庆 400715; 4. 西南大学农业部蚕桑学重点开放实验室, 重庆 400715)

摘要: 谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)是一个功能广泛的超基因家族, 其中 Zeta 家族在动物、植物和细菌中均有分布。在哺乳动物中, Zeta GSTs 具有马来酰乙酰乙酸异构酶(MAAI)活性, 参与苯丙氨酸/酪氨酸的代谢过程。本研究对家蚕 *Bombyx mori* 基因组中预测的 GST 基因(*BmGSTz1*)进行了表达序列标签的搜索, 经拼接后获得一条含有 3′和 5′非翻译区在内的长度为 1 239 bp 的 cDNA 序列, 其 3′端含有 AATAAA 加尾信号。*BmGSTz1* 基因含有 4 个内含子, 外显子/内含子边界均符合 GT-AG 规则。经 TA 克隆证实, *BmGSTz1* 基因编码区序列全长 648 bp, 共编码 215 个氨基酸。BmGSTz1 推定的分子量为 24.8 kD, 等电点 pI 为 8.06。BmGSTz1 与其他昆虫和哺乳动物 GSTz1 的氨基酸序列高度保守, 进化分析表明家蚕 BmGSTz1 与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的 GSTz1 形成 1:1:1:1:1 的直系同源关系。RT-PCR 和基因芯片数据表明 *BmGSTz1* 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫各组织中都有表达。序列和组织表达特征分析结果提示家蚕 BmGSTz1 可能具有 MAAI 活性, 这将为进一步深入研究 *BmGSTz1* 基因的功能提供参考。

关键词: 家蚕; 谷胱甘肽-S-转移酶; 酪氨酸代谢; 序列分析; cDNA 克隆; 表达特征
中图分类号: Q966　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2010)10-1061-08

Molecular cloning, sequence analysis and tissue expression characterization of glutathione S-transferase gene *BmGSTz1* in *Bombyx mori*

YU Quan-You[1], FANG Shou-Min[2], ZUO Wei-Dong[3], ZHANG Ze[1,4], LU Cheng[4,*] (1. Institute of Agricultural and Life Sciences, Chongqing University, Chongqing 400044, China; 2. College of Life Science, China West Normal University, Nanchong, Sichuan 637002, China; 3. College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China; 4. The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Glutathione S-transferases (GSTs) constitute a multifunctional superfamily in which Zeta class is widely distributed in animals, plants, and bacteria. In mammals, Zeta GSTs show maleylacetoacetate isomerase (MAAI) activity and participate in phenylalanine and tyrosine metabolism. In this study, expressed sequence tags (ESTs) were searched for the predicted GST gene from *Bombyx mori*, *BmGSTz1*. A contig containing 1 239 bp was assembled on the basis of ESTs of *BmGSTz1*, which extended into 3′ and 5′- UTR (untranslated region). The contig of *BmGSTz1* perfectly matched to the corresponding region of the silkworm genome sequence and had a poly (A) signal in its 3′- UTR. *BmGSTz1* was composed of 4 introns and 5 exons, and the boundary between exon and intron conformed to the canonical GT-AG rule. TA cloning verified that the coding sequence (CDS) was 648 bp in length and encoded 215 amino acids. The putative molecular weight and isoelectric point of *BmGSTz1* were 24.8 kD and 8.06, respectively. *BmGSTz1* had relatively high similarities with GSTz1 from insects and mammalians. Phylogenetic analysis showed that BmGSTz1, DmGSTz1, AgGSTz1, ApGSTz1, and TcGSTz1 might be 1:1:1:1:1 orthologues. The RT-PCR and microarray data indicated that *BmGSTz1* was expressed in various tissues in Day-3 5th instar silkworm larvae. The results of sequence analysis and expression characterization suggest that BmGSTz1 might have the MAAI activity. The data presented in this study provide useful information for

基金项目: 中央高校基本科研业务费项目(CDJZR10290002); 国家高技术研究发展计划项目(2006AA10A117); 国家重点基础研究发展规划项目(2005CB121000)
作者简介: 余泉友, 男, 1979 年生, 四川武胜人, 博士, 讲师, 研究方向为昆虫功能基因组学, E-mail: yuqy@cqu.edu.cn
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: lucheng@swu.edu.cn
收稿日期 Received: 2010-04-07; 接受日期 Accepted: 2010-06-15

further studying the function of *BmGSTz1*.
Key words: *Bombyx mori*; glutathione S-transferases; tyrosine metabolism; sequence analysis; cDNA cloning; expression characterization

谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferases, GSTs)是一个多功能的超基因家族，广泛分布于动物、植物以及细菌等生物体(Sheehan *et al*., 2001)。根据细胞中的定位，谷胱甘肽-S-转移酶分为微粒体型(microsomal GSTs)、线粒体型(mitochondrial GSTs)和胞质型(cytosolic GSTs)三大类。胞质GSTs由于其普遍存在及功能重要性，是目前研究最为广泛和深入的GSTs类型，通常所指的谷胱甘肽-S-转移酶即为此类型。昆虫胞质谷胱甘肽-S-转移酶包括Omega, Sigma, Theta, Zeta, Delta和Epsilon 6个已知的家族(Ding *et al*., 2003; Ranson and Hemingway, 2005)。Omega, Sigma, Theta和Zeta家族不仅存在于昆虫中，在其他动物或植物等物种中也有分布。Delta和Epsilon为昆虫特异的家族，仅存在于昆虫生物体中。

谷胱甘肽-S-转移酶的功能广泛，如去除蛋白质中的巯基加合物(Board *et al*., 2000)，作为结构蛋白分布于昆虫间接飞翔肌(indirect flight muscles)(Ranson and Hemingway, 2005)，参与酪氨酸代谢(Board *et al*., 1997)，其主要功能则是参与外源和内源有毒物质的解毒代谢，与昆虫抗药性形成相关(Li *et al*., 2007)。此外，因昆虫体内缺乏功能性的硒依赖性谷胱甘肽过氧化物酶(selenium-dependent glutathione peroxidases, SeGPx)，GSTs具有硒非依赖性的谷胱甘肽过氧化物酶(non-SeGPx)活性，能对脂质过氧化的中间产物磷脂过氧化氢(phospholipid hydroperoxides)和脂肪酸过氧化氢(fatty acid hyroperoxides)及终产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)和4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal, 4-HNE)等有机氢过氧化物解毒(Parkes *et al*., 1993)。

由于昆虫特异的Delta和Epsilon GSTs在杀虫剂抗性中起着重要作用，因此得到了广泛的关注(Li *et al*., 2007)。但是其他的GSTs家族，特别是Zeta基因在昆虫中的研究报道较少。Zeta基因作为功能重要的GSTs类型，在哺乳动物、真菌和植物的功能已得到较深入地认识(Board *et al*., 1997; Marsh *et al*., 2008)。研究表明，动植物的Zeta基因参与了苯丙氨酸/酪氨酸的生理代谢过程，它作为马来酰乙酰乙酸异构酶(maleylacetoacetate isomerase, MAAI)将马来酰乙酰乙酸(maleylacetoacetate, MAA)异构化为延胡索酰乙酰乙酸(fumarylacetoacetate, FAA)(Fernández-Cañón *et al*., 1999)。苯丙氨酸/酪氨酸代谢已在哺乳动物中证实是一个非常重要的生理过程，其代谢途径的终止常导致多种疾病发生，如人缺失尿黑酸双加氧酶(homogentisate dioxygenase, HDO)会导致尿黑酸尿；延胡索酰乙酰乙酸水解酶(fumarylacetoacetate hydrolase, FAH)的缺失则产生高酪氨酸血症(Fernández-Cañón and Peñalva, 1998)；敲除MAAI的小鼠将出现肝和肾脏肿大、脾萎缩等症状(Lim *et al*., 2004)。

家蚕*Bombyx mori*作为遗传学上具有重要地位的模式生物，其全基因组精细图已测序完成，为研究家蚕GSTs提供了良好契机。Yu等(2008)基于家蚕全基因组序列共鉴定出23个GSTs基因，并对其作了比较基因组学分析。一些学者对家蚕GSTs的诱导表达进行研究，发现BmGSTs2和BmGSTd2能被20-羟基蜕皮酮(2-hydroxyecdysone, 20E)诱导，而被保幼激素类似物(juvenile hormone analog, JHA)所抑制(Zou *et al*., 2010)；BmGSTs2能被除草剂草甘膦(glyphosate)和杀虫剂氯菊酯(permethrin)诱导表达(Gui *et al*., 2009)。另有学者对家蚕GSTs进行了克隆和外源表达等研究(Yamamoto *et al*., 2009a；潘敏慧等，2010)。因此，家蚕GSTs获得了较广泛的关注。苯丙氨酸/酪氨酸代谢途径作为哺乳动物体内的重要生理过程，其代谢途径的缺陷常导致多种疾病的发生。但是昆虫体内是否也存在苯丙氨酸/酪氨酸代谢途径，以及是否具有功能性的GSTz/MAAI等研究均尚无报道。我们主要针对家蚕中可能具有MAAI活性的GST基因(*BmGSTz1*)进行克隆、序列分析，并检测了它在5龄幼虫不同组织的表达特征，为进一步研究该基因的功能及酪氨酸代谢途径提供参考。

1　材料与方法

1.1　家蚕材料与RNA提取

以华系二化性品种大造(P50)为实验材料，饲育温度25 ± 1℃，相对湿度70% ~80%，新鲜桑叶育。取5龄第3天幼虫中肠、脂肪体等组织器官，

用生理盐水和 DEPC 水冲洗后储存于液氮中备用。

TRIzol 试剂（Invitrogen）提取家蚕总 RNA，经 DNase Ⅰ（RNase Free）处理后用 M-MLV 反转录酶（TaKaRa）反转录得到 cDNA 第一链，并以此为模板进行 PCR 扩增，所有步骤均按试剂的使用说明书进行。

1.2　引物设计

在对家蚕 GSTs 全基因组信息分析（Yu *et al.*，2008）的基础上，以预测的 *BmGSTz1* 编码区序列（coding sequence，CDS）与 GenBank 数据库（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）中的家蚕 ESTs 进行 Blastn 比对（E value ≤ e-30），获得的 ESTs 用 DNASTAR 软件中的 Seqman 进行拼接，将拼接的重叠序列作为种子序列再次在 GenBank 的家蚕 ESTs 数据库重复检索、延伸，直到不能延伸为止。对 ESTs 拼接序列重新预测编码基因，并以 Primer 5.0 设计克隆完整 CDS 的特异引物。

1.3　家蚕 *BmGSTz1* 基因的 cDNA 克隆

克隆 *BmGSTz1* 基因的正向引物为 5′-TTCATCCTCTGCCATGGGCAAG-3′和反向引物为 5′-TGTTATGGGCAAAGTTCATTTAGCA-3′。家蚕 5 龄第 3 天脂肪体的 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增。25 μL 的 PCR 反应体系含有：2.5 μL 10 ×PCR 缓冲液，2 μL 25 mmol/L $MgCl_2$，2 μL 2.5 mmol/L dNTP，10 μmol/L 正反向引物各 1 μL，2 μL cDNA，1 U Taq DNA 聚合酶，超纯水补足 25 μL。PCR 在 Eppendorf 热循环仪上进行，反应条件为：94℃ 预变性 4 min；94℃变性 30 s；58℃退火 40 s；72℃延伸 1 min；运行 35 个循环；72℃终延伸 10 min，于 4℃保存。扩增产物用上海华舜胶回收试剂盒进行 DNA 回收，将回收的 DNA 片段与 pMD18-T 载体连接，进行 TA 克隆和酶切鉴定，阳性克隆送往上海生工进行测序。

1.4　组织表达特征的 RT-PCR 检测

由于肌动蛋白基因是一种持家基因，在各组织中的表达水平相对恒定，通常被用作内参基因。因此，本研究选用家蚕 *Actin3* 基因（GenBank 登录号：BMU49854）作为内参，以各组织 cDNA 为模板进行 PCR 扩增和电泳检测，从而以该基因的表达水平为参照将各组织 cDNA 浓度调整为基本一致，其方法是在 cDNA 浓度较高的组织样品中适当加入一定超纯水进行稀释，而后以 *Actin3* 基因再次进行 RT-PCR 检测，直至 *Actin3* 基因在各组织中的表达量基本一致。*Actin3* 基因的正向引物：5′-AACACCCCGTCCTGCTCACTG-3′；反向引物：5′-GGGCGAGACGTGTGATTTCCT-3′。检测 *BmGSTz1* 基因组织表达特征的引物见本研究 1.3。反应条件为：94℃ 预变性 4 min；94℃变性 30 s；58℃退火 40 s；72℃延伸 1 min；运行 25 个循环；72℃终延伸 10 min 于 4℃保存。反应产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2　结果

2.1　*BmGSTz1* 基因的克隆与基因结构

基于 Yu 等（2008）对家蚕 GSTs 全基因组的鉴定，我们以预测的 *BmGSTz1* 编码区序列搜索 NCBI（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）的家蚕 ESTs 数据库，共发现了 14 条 ESTs，经 Seqman 拼接获得长度为 1 239 bp 的 cDNA 序列，3′端存在一可能的 AATAAA 加尾信号（图 1）。以拼接后的序列设计克隆完整 CDS 的特异引物，证实 *BmGSTz1* 的 CDS 长度 648 bp（GenBank 登录号：DQ355375）。BmGSTz1 由 215 个氨基酸组成，预测的分子量为 24.8 kD，等电点（pI）为 8.06。用 sim4（http://pbil.univ-lyon1.fr/sim4.php）程序将含有非编码区的 1 239 bp cDNA 序列与家蚕基因组序列比对，结果显示 *BmGSTz1* 含有 4 个内含子，外显子/内含子边界均符合 GT-AG 规则。

除了对家蚕 Zeta 基因结构分析外，我们基于 GenBank 数据对其他几种模式昆虫 Zeta 基因结构也进行了绘制（图 2）。比较分析发现，各昆虫间 Zeta 基因内含子插入位点并不呈现保守性，表明在物种进化过程中 Zeta 基因结构发生了较大变化。家蚕的 2 个 Zeta 基因分别有 4 个内含子，而黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* Zeta 基因均只有 2 个内含子，意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 均只有 3 个。相对其他物种而言，家蚕 Zeta 基因结构趋于复杂化，而且内含子插入位置也相对保守。

2.2　BmGSTz1 的保守性进化

为了解 BmGSTz1 与其他物种 Zeta GSTs 的亲缘关系，我们从 GenBank 中下载了其他物种的 Zeta GSTs 氨基酸序列，并以 MEGA 4.0 构建了 NJ 树（neighbor-joining tree）（图 3）。图中显示，Zeta GSTs 分为昆虫、哺乳动物、植物和细菌 4 个类群。除家蚕和果蝇外，其他几种昆虫的 Zeta GSTs 均为单拷贝基因。家蚕 BmGSTz1、冈比亚按蚊 AgGSTz1、黑

```
   1                        ggagcttcttagcgtttgtttataatctcatcttttataaat
  43 attcaaacttagcgattcttgtctaaaaggacaaacaaaaccgtcaaaattacgtactat
 103 aacaaatataatggttccgtttcatcctctgccATGGGCAAGCAGCCAGTATTATACTCA
   1                                  M  G  K  Q  P  V  L  Y  S
 163 TACTGGCGCAGCTCATGCTCCTGGCGAGTTCGCATAGCACTCAATCTTAAAGAAATACCA
  10  Y  W  R  S  S  C  S  W  R  V  R  I  A  L  N  L  K  E  I  P
 223 TACGACATAAAGGCTGTCAGCCTGATTAAGGGAGGCGGAGAACAACACTGCAATGAGTAT
  30  Y  D  I  K  A  V  S  L  I  K  G  G  G  E  Q  H  C  N  E  Y
 283 AGAGAAGTCAACCCTATGGAGCAAGTACCATCTTTATGCATTGATGGGCACACTCTAATT
  50  R  E  V  N  P  M  E  Q  V  P  S  L  C  I  D  G  H  T  L  I
 343 GAATCATTAAACATCATGCATTATTTAGAGGAGACAAGACCACAGAGACCTCTTATGCCG
  70  E  S  L  N  I  M  H  Y  L  E  E  T  R  P  Q  R  P  L  M  P
 403 CAAGATTGCTTTAAGAGGGCAAAAGTTCGTGAAATTTGTGAAATGATAGCCTCAGGAATA
  90  Q  D  C  F  K  R  A  K  V  R  E  I  C  E  M  I  A  S  G  I
 463 CAGCCATTGCAGAATCTGATTGTGCTAATTTATGTTGGTGAGGAGAAAAAGAAGGAATGG
 110  Q  P  L  Q  N  L  I  V  L  I  Y  V  G  E  E  K  K  K  E  W
 523 TCCCAACACTGGATCACAAGGGGCTTCAGAGCTATAGAAAAGTTGCTATCGACCACTGCC
 130  S  Q  H  W  I  T  R  G  F  R  A  I  E  K  L  L  S  T  T  A
 583 GGAAAATATTGTGTTGGTGATGAGATTACCCTTGCCGATTGCTGCTTAGTTCCACAAGTG
 150  G  K  Y  C  V  G  D  E  I  T  L  A  D  C  C  L  V  P  Q  V
 643 TTCAATGCTAGAAGATTTCATGTTGATCTACGTCCGTTCCCAATCATCCTCCGCATAGAC
 170  F  N  A  R  R  F  H  V  D  L  R  P  F  P  I  I  L  R  I  D
 703 CGTGAACTGGAGAATCATCCCGCATTCCGTGCGGCTCATCCATCTTCTCAGCCAGATTGT
 190  R  E  L  E  N  H  P  A  F  R  A  A  H  P  S  S  Q  P  D  C
 763 CCCCCAGAAGTTGCTAAATGAactttgcccataacatacctaatgtttttgccaaattta
 210  P  P  E  V  A  K  -
 823 atatttcatttttgatcaggaactgcctgatatacataaatttaattagcccttgttttt
 883 ctctaaacccatatttaatacacttaggcttagtttagcagcttcactttacattaatca
 943 acagtaggaactttattaaaaatatacacattcgaatttcttcatttcattatgaagaaa
1003 atggaaaacatgctagtctaaaatttaaaatttttataataatatttacatttaatacat
1063 acatttgaaatcgacttcttaagtgttaaattaaatttttacgcttattacattccaatc
1123 taatgaacttcgcttttagaagtcctaggtttaagcgaatttttttgtttcatattatgt
1183 tatgttctttataaaataataaaactttatttttaagttttgaacaaaaaaaaaa
```

图 1 家蚕 GST 基因(*BmGSTz1*)的 cDNA 序列及推测的氨基酸序列

Fig. 1 The cDNA and deduced protein sequences of the GST gene (*BmGSTz1*) from *Bombyx mori*

下划线部分代表可能的加尾信号 The poly(A) addition signal is underlined.

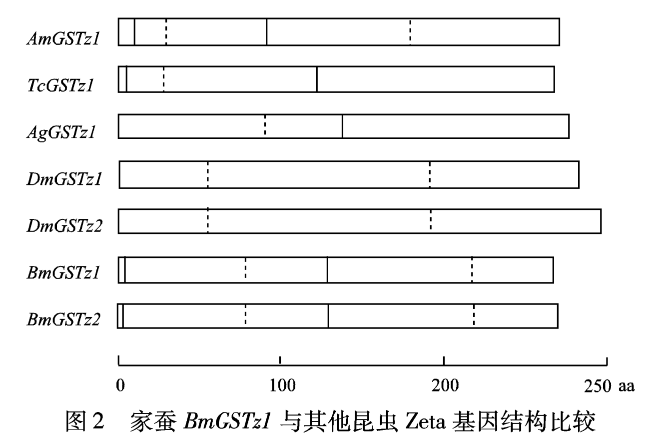


图 2 家蚕 *BmGSTz1* 与其他昆虫 Zeta 基因结构比较

Fig. 2 Comparison of gene structure between *BmGSTz1* and GSTz genes from other insects

实心竖线、点线和虚线分别表示 0, 1 和 2 相位内含子 The phase 0, 1, and 2 introns are shown by solid line, dotted-line and dashed-line, respectively. *Bm*: 家蚕 *Bombyx mori*; *Ag*: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*; *Am*: 意大利蜜蜂 *Apis mellifera*; *Dm*: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*; *Tc*: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*.

腹果蝇 DmGSTz1、赤拟谷盗 TcGSTz1 和意大利蜜蜂 AmGSTz1 系统发生关系较近，能形成一个稳定的进化枝，其节点处的 Bootstrap 值为 100，因此家蚕 *BmGSTz1* 与其他 4 种昆虫的 GSTz1 基因可能为直系同源基因。*BmGSTz1* 与其直系同源基因高度保守，氨基酸序列一致性高达 81% ~86.4%。另外，BmGSTz1 与哺乳动物小鼠 *Mus musculus* MmGSTz1，大鼠 *Rattus norvegicus* RnGSTz1，人 *Homo sapiens* HsGSTz1 也具有非常高的氨基酸序列一致性，分别为58.7%，58.3% 和 56.4%。家蚕与黑腹果蝇类似，也存在 2 个 Zeta 基因。尽管家蚕 BmGSTz1 和 BmGSTz2 的基因结构非常相似(图 2)，但是在序列上却发生了较大的分化，BmGSTz1 和 BmGSTz2 的氨基酸序列一致性仅为 43.5%。因此，BmGSTz1 与其直系同源基因的进化速率较低，而其重复基因 BmGSTz2 呈现出较高的进化速率。

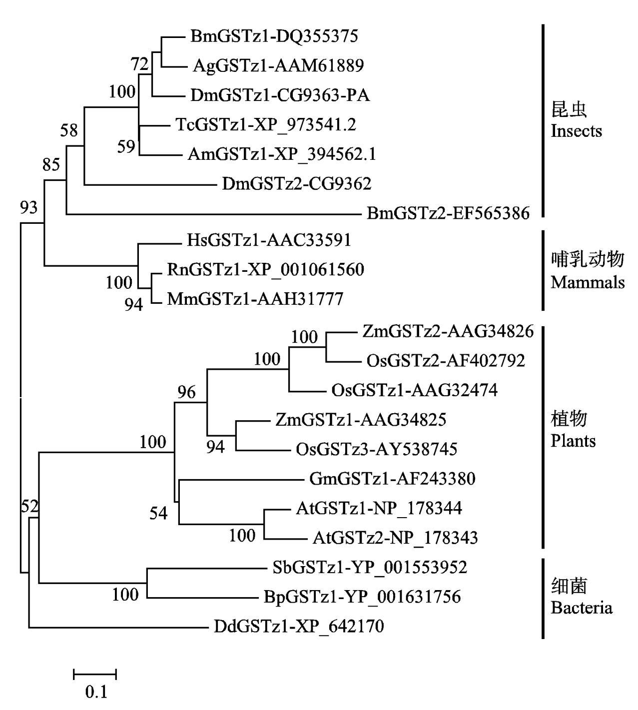


图 3　家蚕 GSTs 和其他物种 GSTs 的 NJ 树

Fig. 3　Neighbor-joining tree of GSTs from *Bombyx mori* and related species

基于 MEGA 4.0 构建的邻近树，选取的重要参数为：JTT 模型、成对删除 gaps 及 1 000 重复；节点处仅显示了 >50% 的 Bootstrap 值。JTT model and pairwise deletion of gaps were selected for the tree reconstruction in the program MEGA 4.0. Bootstrap values (1 000 replicates) >50% are shown.

Bm：家蚕 *Bombyx mori*；Ag：冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*；Am：意大利蜜蜂 *Apis mellifera*；Dm：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*；Tc：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*；Mm：小鼠 *Mus musculus*；Rn：大鼠 *Rattus norvegicus*；Hs：人 *Homo sapiens*；Zm：玉米 *Zea mays*；At：拟兰芥 *Arabidopsis thaliana*；Os：水稻 *Oryza sativa*；Gm：大豆 *Glycine max*；Sb：希瓦氏菌 *Shewanella baltica*；Bp：博得特氏菌 *Bordetella petrii*；Dd：盘基网柄菌 *Dictyostelium discoideum*. 图 4 同 The same for Fig. 4.

BmGSTz1 与其他 GSTs 一样，包含 N 末端和 C 末端两个保守结构域。N 末端主要由 β-α-β-α-β-β-α 共 7 个结构基序组成，而 C 末端由 5 个 α 螺旋构成，无 β 折叠结构（图 4）。Zeta GSTs 的 N-末端往往包含一个高度保守的特征性结构域 SSCxWRVIAL，该结构域的第一个 Ser 为 GSTs 的催化活性位点（Board *et al*., 1997）。BmGSTz1 与小鼠具有 MAAI 活性的 MmGSTz1 拥有相同的保守序列，均为 SSCSWRVIAL，但是家蚕 BmGSTz2 保守域中的 I 和 A 残基则分别突变为 A 和 M。因此，结构域分析也显示 *BmGSTz1* 为进化上高度保守的基因。

2.3　*BmGSTz1* 的表达模式

分离 5 龄家蚕第 3 天幼虫的血淋巴细胞、中肠、头部、丝腺、体壁、脂肪体、精巢与卵巢各组织器官，提取总 RNA 并反转录合成 cDNA，对 *BmGSTz1* 进行 RT-PCR 扩增。结果表明，*BmGSTz1* 在分析的各组织中都有表达（图 5：B）。根据家蚕全基因组表达谱芯片（Xia *et al*., 2007），我们对 *BmGSTz1* 芯片数据进行了比较分析（图 5：A），其结果与 RT-PCR 相似的是 *BmGSTz1* 在各组织中均有表达，但也存在一定差异，如脂肪体中芯片检测的结果表达量较低，而 RT-PCR 中表达量较高；丝腺及头部中的表达量也不尽一致。据图 5（A）所示，*BmGSTz1* 在体壁和中肠表达量最高，而在血淋巴细胞、丝腺和脂肪体的表达量相对较低。

3　讨论

在家蚕 GSTs 的基因组分析鉴定（Yu *et al*., 2008）基础上，我们对预测的 *BmGSTz1* 基因进行了 ESTs 分析。获得的 ESTs 经拼接得到 1 239 bp 的 cDNA 序列，其 3′端非编码区存在可能的 AATAAA 加尾信号。经 cDNA 克隆证实，*BmGSTz1* 基因 CDS 全长 648 bp，共编码 215 个氨基酸。*BmGSTz1* 基因由 5 个外显子和 4 个内含子组成，外显子/内含子边界均符合 GT-AG 规则。BmGSTz1 与哺乳动物 GSTz1/MAAI 的氨基酸序列和蛋白质结构高度相似，并且与特征序列 SSCxWRVIAL 也完全相同，因此推测 *BmGSTz1* 可能具有 MAAI 基因的活性。苯丙氨酸/酪氨酸代谢途径主要是在哺乳动物的肝脏和肾脏中进行，但是表达模式分析发现 MAAI 在其他多种组织均有表达，这提示其可能还具有其他功能（Fernández-Cañón *et al*., 1999）。体外酶活性鉴定表明 MAAI 具有将二氯乙酸（dichloroacetic acid, DCA）脱氯代谢为乙醛酸（glyoxylic acid）的活性（Lim *et al*., 2004）。基因芯片和 RT-PCR 的结果表明 *BmGSTz1* 在各组织中均有表达（图 5），但在脂肪体、丝腺和头部的表达量存在差异，可能导致的原因为：其一，尽管芯片和 RT-PCR 均研究的是家蚕 5 龄第 3 天的各组织，但取材的发育时期可能不一致；其二，RT-PCR 是一种半定量技术，可能存在一定的实验误差。值得肯定的是基因芯片和 RT-PCR 均证实 *BmGSTz1* 在各组织中广泛表达，这与哺乳动物 MAAI 相似，因此推测家蚕 *BmGSTz1* 可能在维持家蚕各组织免受二氯乙酸等外源毒性物质伤害中也起着重要的作用。

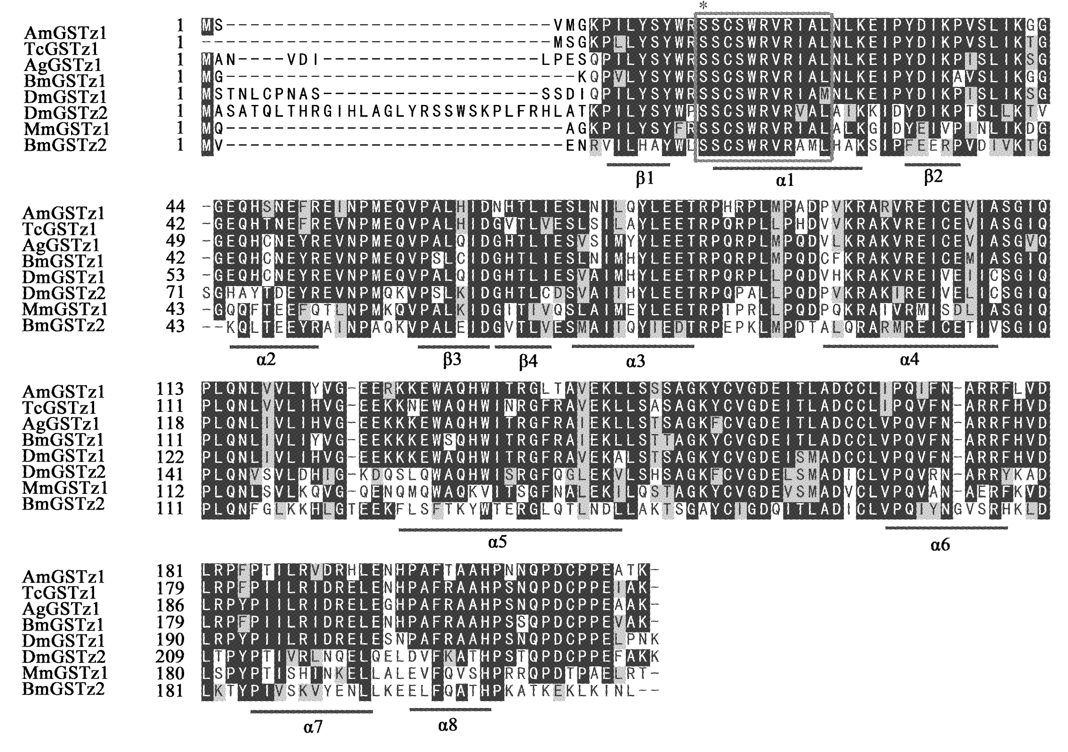


图 4 昆虫 GST Zeta 家族的多序列比对

Fig. 4 Sequence alignment of insect Zeta GSTs

以 Clustal X 进行多序列比对，然后在 BoxShade（http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html）中标注。黑色阴影表示相同氨基酸，灰色阴影表示相似氨基酸，域值为 0.5。星号代表催化活性位点、横线处代表 Zeta 家族的二级结构域（Thom *et al*., 2001）。方框标定的序列为 Zeta GSTs 的特征性结构域。Alignments were done using Clustal X with default parameters and shading was done using BoxShade with the expected value (0.5). The identical (or similar) residues are shaded black (or gray), and the expected value is defined as 0.5. The catalytic residue Ser is marked with an asterisk. The structural domains of GSTs were underlined (Thom *et al*., 2001). A fingerprint motif of Zeta GSTs was boxed.

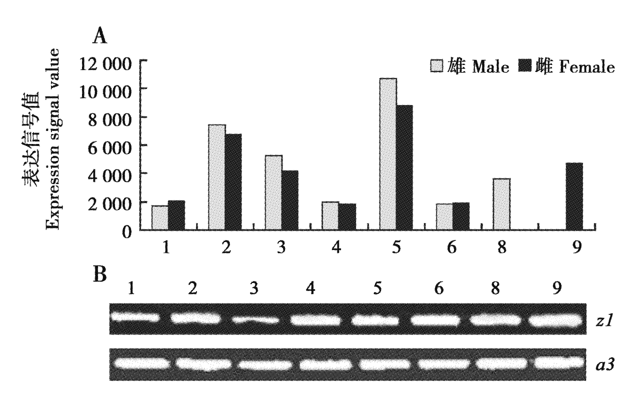


图 5 *BmGSTz1* 在家蚕幼虫不同组织中的表达

Fig. 5 Expression of *BmGSTz1* in various tissues of *Bombyx mori* larvae

A：基于家蚕 5 龄第 3 天组织芯片的表达 The expression of *BmGSTz1* based on microarray datasets；B：RT-PCR 检测 *BmGSTz1* 在家蚕 5 龄第 3 天各组织的表达 The expression of *BmGSTz1* based on RT-PCR analysis (B). 芯片数据下载自 http://silkworm.swu.edu.cn/microarray/，*BmGSTz1* 的探针号为 sw22882。The microarray data of *BmGSTz1* was downloaded from http://silkworm.swu.edu.cn/microarray/, and the microarray probe is sw22882. 1：血淋巴细胞 Homocyte；2：中肠 Midgut；3：头 Head；4：丝腺 Silkgland；5：表皮 Epidermis；6：脂肪体 Fat body；7：精巢 Testis；8：卵巢 Ovary.

Zeta 基因在昆虫和哺乳动物中往往是单拷贝，分析的几种模式昆虫也仅有家蚕和果蝇含有 2 个拷贝。家蚕 *BmGSTz1* 与 *BmGSTz2* 基因的氨基酸序列一致性仅为 43.5%，远低于 *BmGSTz1* 与其直系同源基因的相似性（图 4）。*BmGSTz2* 基因在重复产生后受到的约束较小，其进化速率快，可能在家蚕适应特殊生境中起着重要作用。Yamamoto 等（2009b）克隆了 *BmGSTz2* 基因并进行了体外表达和纯化，体外活性研究发现它能对二氯乙酸（dichloroacetic acid，DCA）和氯菊酯（permethrin）进行脱氯代谢，并且 Western blot 检测表明 *BmGSTz2* 在氯菊酯抗性家蚕脂肪体中的表达量明显高于敏感系，推测 *BmGSTz2* 基因可能与氯菊酯抗性相关。组织表达特征（图 5）和对哺乳动物 Zeta/MAAI 基因的研究（Lim *et al*., 2004）提示着家蚕 BmGSTz1 可能具有二氯乙酸（dichloroacetic acid，DCA）脱氯代谢功能。因此，尽管 *BmGSTz1* 与 *BmGSTz2* 在序列上发生了较大分歧，但是保守进化基因 *BmGSTz1* 是否具有 *BmGSTz2* 相似的解毒功能仍值得深入研究。

酪氨酸代谢途径是哺乳动物体内重要的生理过程，该途径的中断会导致多种疾病的发生。植物体内也存在与哺乳动物相似的酪氨酸代谢途径，研究证实 FAH 酶活性能被 1,3-环己二酮(cyclohexane-1,3-dione)、苯并异恶唑(benzoyl isozazole)和相关除草剂抑制，导致 MAA 大量堆积而产生毒性(Dixon *et al*., 2000)。于昆虫而言，该途径相关基因却鲜有研究，昆虫是否存在酪氨酸代谢途径也需进一步证实。为了解昆虫是否具有类似的酪氨酸途径，我们对家蚕基因组中另两个重要蛋白——尿黑酸双加氧酶(HDO)和延胡索酰乙酰乙酸水解酶(FAH)——的基因进行了分析。经鉴定家蚕 BmHDO(http://www.silkdb.org/silkdb/，检索号：BGIBMGA007324)与果蝇 DmHDO(GenBank 登录号：AAF53078.2)和人 HsHDO(GenBank 登录号：AAB16836.1)的氨基酸序列一致性分别为 73.4% 和65.4%。BmFAH(http://www.silkdb.org/silkdb/，检索号：BGIBMGA007438)与 DmFAH(GenBank 登录号：NP_524830.2)和 HsFAH(GenBank 登录号：AAA52422.1)的序列一致性分别为 54.7% 和 57.6%。并且 BmHDO 和 BmFAH 均有 ESTs 表达证据。分析结果提示家蚕基因组中可能存在有功能性的 BmHDO 和 BmFAH，同时也提示昆虫体内可能存在与动植物相似的酪氨酸代谢途径。本实验通过对家蚕 *BmGSTz1* 基因的克隆及组织表达特征研究，为进一步深入探讨 *BmGSTz1* 基因的功能等相关研究可提供参考。

参 考 文 献(References)

Board PG, Baker RT, Chelvanayagam G, Jermiin LS, 1997. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem. J*., 328(Pt3): 929-935.

Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Easteal S, Jermiin LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth LR, Griffor MC, Kamath AV, Rosner MH, Chrunyk BA, Perregaux DE, Gabel CA, Geoghegan KF, Pandit J, 2000. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem*., 275(32): 24798-24806.

Ding Y, Ortelli F, Rossiter LC, Hemingway J, Ranson H, 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics*, 4: 35.

Dixon DP, Cole DJ, Edwards R, 2000. Characterisation of a zeta class glutathione transferase from *Arabidopsis thaliana* with a putative role in tyrosine catabolism. *Arch. Biochem. Biophys*., 384(2): 407-412.

Fernández-Cañón JM, Hejna J, Reifsteck C, Olson S, Grompe M, 1999. Gene structure, chromosomal location, and expression pattern of maleylacetoacetate isomerase. *Genomics*, 58(3): 263-269.

Fernández-Cañón JM, Peñalva MA, 1998. Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *J. Biol. Chem*., 273(1): 329-337.

Gui Z, Hou C, Liu T, Qin G, Li M, Jin B, 2009. Effects of insect viruses and pesticides on glutathione S-transferase activity and gene expression in *Bombyx mori*. *J. Econ. Entomol*., 102(4): 1591-1598.

Li X, Schuler MA, Berenbaum MR, 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol*., 52: 231-253.

Lim CE, Matthaei KI, Blackburn AC, Davis RP, Dahlstrom JE, Koina ME, Anders MW, Board PG, 2004. Mice deficient in glutathione transferase zeta/maleylacetoacetate isomerase exhibit a range of pathological changes and elevated expression of alpha, mu and pi class glutathione transferases. *Am. J. Pathol*., 165(2): 679-693.

Marsh M, Shoemark DK, Jacob A, Robinson C, Cahill B, Zhou NY, Williams PA, Hadfield AT, 2008. Structure of bacterial glutathione-S-transferase maleyl pyruvate isomerase and implications for mechanism of isomerisation. *J. Mol. Biol*., 384(1): 165-177.

Pan MH, Xu Y, Yu QY, Liu J, Liu D, Zhao DH, Lu C, 2010. Identification and eukaryotic expression of GSTe-3 gene of silkworm (*Bombyx mori*). *Scientia Agricultura Sinica*, 43(4): 873-880. [潘敏慧，许湲，余泉友，刘佳，刘迪，赵丹红，鲁成，2010. 家蚕谷光甘肽-S-转移酶 GSTe3 基因的鉴定及其真核表达. 中国农业科学，43(4): 873-880]

Parkes TL, Hilliker AJ, Phillips JP, 1993. Genetic and biochemical analysis of glutathione S-transferases in the oxygen defence system of *Drosophila melanogaster*. *Genome*, 36(6): 1007-1014.

Ranson H, Hemingway J, 2005. Glutathione transferases. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS eds. Comprehensive Molecular Insect Science - Pharmacology. Elsevier Press, Oxford. 383-398.

Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA, 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J*., 360(Pt1): 1-16.

Thom R, Dixon DP, Edwards R, Cole DJ, Lapthorn AJ, 2001. The structure of a zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: characterisation of a GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism. *J. Mol. Biol*., 308(5): 949-962.

Xia Q, Cheng D, Duan J, Wang G, Cheng T, Zha X, Liu C, Zhao P, Dai F, Zhang Z, He N, Zhang L, Xiang Z, 2007. Microarray-based gene expression profiles in multiple tissues of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *Genome Biol*., 8(8): R162.

Yamamoto K, Nagaoka S, Banno Y, Aso Y, 2009a. Biochemical properties of an omega-class glutathione S-transferase of the silkmoth, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol*., 149(4): 461-467.

Yamamoto K, Shigeoka Y, Aso Y, Banno Y, Kimura M, Nakashima T,

2009b. Molecular and biochemical characterization of a Zeta-class glutathione S-transferase of the silkmoth. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 94(1): 30-35.

Yu Q, Lu C, Li B, Fang S, Zuo W, Dai F, Zhang Z, Xiang Z, 2008. Identification, genomic organization and expression pattern of glutathione S-transferase in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(12): 1158-1164.

Zou FM, Lou DS, Zhu YH, Wang SP, Jin BR, Gui ZZ, 2010. Expression profiles of glutathione S-transferase genes in larval midgut of *Bombyx mori* exposed to insect hormones. *Mol. Biol. Rep.* DOI: 10.1007/s11033-010-0150-y.

（责任编辑：赵利辉）